

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 飯田 昌樹

横浜市立大学大学院医学研究科

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 折舘 伸彦

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 谷口 英樹

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 宮城 悦子

博士の学位論文審査結果の要旨

口腔扁平上皮癌患者末梢血における CD57⁺T 細胞亜集団の検討

口腔癌の治療は手術療法が主体となるが、特に進行口腔癌では切除範囲が大きくなることから、摂食・嚥下障害、構音障害や顔面の変形による審美障害などによる QOL の低下が問題となる。また、手術療法や化学放射線療法などの集学的治療の発達により治療成績の向上が図られているが、口腔癌全体の全生存率は約 60%であり、さらなる治療成績の向上が望まれている。他領域の癌腫と同様に口腔癌においても、予後の改善のためには早期発見、早期治療が最も重要であり、近年口腔癌検診への取り組みが注目されている。一方、口腔癌は原発巣が増大するに伴い頸部リンパ節転移、肺などへの遠隔転移の可能性が高くなるが、まれに原発巣が小さな癌においても遠隔転移を来し予後不良となる症例もある。治療前には通常 PET - CT, MRI, 超音波検査などの画像検索により病期診断を行うが、予後に対する評価を治療前、あるいは治療中に行うことは困難であることから、治療前に悪性度診断あるいは予後診断を予測可能な新しい診断技術が今後望まれる。

近年、癌に対する免疫療法の研究と共に、新しい診断技術として癌患者の免疫能の評価に対する研究が行われており、特に腫瘍免疫の中心を担う T 細胞亜集団について、抑制性 T 細胞などと予後との相関についても報告されている。また、T 細胞の分化に関係するマーカーである CD57 と、癌や免疫不全状態を来す各種疾患などとの関係について多くの研究がなされている。

本研究ではこれまでに検討されていなかった口腔癌と CD57⁺T 細胞との関係について明らかにし、口腔癌における予後診断の一助となる可能性について口腔癌の 80%を占める口腔扁平上皮癌を対象に検討を行った。

2010 年 4 月から 2013 年 3 月までの 3 年間に横浜市立大学附属病院歯科・口腔外科・矯正歯科を受診した口腔扁平上皮癌の一次症例で、研究参加の同意が得られた 43 例を対象とした。対象症例は男性が 32 例、女性が 11 例で平均年齢は 65.9 歳であった。全例で生検を施行し、病期分類は UICC の分類に従って行った。

口腔癌の治療開始前に採血を行い、末梢血 0.05ml を FITC 標識抗 CD57 抗体、PE 標識抗 TCR β 抗体、APC 標識抗 CD4 抗体、PerCP-Cy5.5 標識抗 CD8 抗体で染色し FACS 解析を行い、CD57⁺T 細胞の割合と病期分類との関係について検討した。

末梢血リンパ球における CD57⁺T 細胞の割合、および全 T 細胞における CD57⁺T 細胞の割合は stage I に対して stage III, IV で有意に増加していたが、全 T 細胞の割合は病期との関連を認めなかった。また、末梢血リンパ球における CD8⁺T 細胞の割合は stage I に対して stage III, IV で、CD8⁺CD57⁺T 細胞の割合は stage I に対して stage IV で有意に増加していた。さらに、末梢血リンパ球における CD4⁺T 細胞の割合は stage I に対して stage II, III, IV でそれぞれ減少していたが、CD4⁺CD57⁺T 細胞の割合は stage I に対して stage III, IV で有意に増加していた。

T 分類に基づいて CD57⁺T 細胞の割合を検討したところ末梢血リンパ球に対する CD8⁺CD57⁺T 細胞の割合、CD4⁺T 細胞に対する CD4⁺CD57⁺T 細胞の割合ともに stage I に対して IV で増加していた。

口腔扁平上皮癌患者の末梢血において、CD8⁺CD57⁺T 細胞、CD4⁺CD57⁺T 細胞ともに CD57⁺T 細胞亜集団は病期の進行、および腫瘍径の増大に伴って増加していた。CD8⁺CD57⁺T 細胞はこれまでの報告で最終分化型の細胞障害性 T 細胞であると考えられているが、その腫瘍免疫における機能については未だ明らかになっていない。一方、CD4⁺CD57⁺T 細胞も腫瘍の進行に伴って増加しており、この細胞集団は腫瘍増殖に関連するエフェクター細胞であると考えられている。いずれの細胞集団も機能については明確ではないが、口腔扁平上皮癌患者の末梢血 CD57⁺T 細胞亜集団は他領域の癌腫と類似した傾向を示しており、この細胞集団の検討は口腔癌の予後診断の一助となる可能性が示唆された。

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、谷口副査より以下の質問と意見がなされた。

1. CD57 は細胞膜表面に存在する分子であるのに、膜透過処理を行っているがその理由はなぜか。また同一サンプルで膜透過処理の有無による FACS 結果に齟齬がないか予備実験を行ったか。
2. FACS 解析においてデブリを多く拾いすぎているので、FSC のゲート設定を変えてデブリの取り込みをより少なくした上で解析を行った方が精度の高い結果が得られるはずである。
3. 過去の報告で CD28 と CD57 は逆相関しているので、本研究でも CD28 の発現を確認すべきであった。また CD28 と CD57 が一気に切り替わるのではなく、徐々に逆相関していくのであればとしたら、その移行部分にこそ知見が得られる可能性があると考えられる。
4. FACS 解析は割合、頻度を解析しているにすぎず、サンプルが臨床検体の場合には絶対

数の変化についても確認すべきである。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 膜透過処理は、膜内分子である **Foxp3** の抗体染色を行う目的で行った。しかし注目した **CD57** は膜表面分子なので膜透過処理がアーチファクトの原因になる可能性は否定できない。また本研究では膜透過処理の有り無しで **FACS** データに齟齬がないかを確認していないが、肝細胞癌を対象にした先行研究(Shiraki et al., 2011) と同じプロトコルで実験を行っており、先行研究では膜透過処理の有り無しで **FACS** データに問題となる隔たりがないことは確認されている。

次に、宮城副査より以下の質問と意見がなされた。

1. **CD57** の以外に、他の臨床的なパラメーターを含めて多変量解析を行ったか。
2. 口腔癌の予後因子となり得る、**HPV**、喫煙、飲酒などと **CD57** の発現との関連について検討を行ったか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 今回の研究では多変量解析は行っていない。今後、本研究の対象患者の予後を含めた検討を行う際には他のパラメーターを含めて多変量解析を行う予定である。
2. **HPV** については検討していないが、飲酒と喫煙については検討を行い、**CD57** の発現との関連は認められなかった。

最後に、折館主査より以下の質問と意見がなされた。

1. 口腔癌患者末梢血における **CD57** 発現の診断的意義について、申請者はどのように考えているか。
2. 病期の進行にともなって **CD8⁺CD57⁺T** 細胞も **CD4⁺CD57⁺T** 細胞もその割合が増加したとの結果であるが、**CD57⁺T** 細胞中の **CD4/CD8** バランスは検討したか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 本研究は、過去の報告と同様に口腔扁平上皮癌患者においても病期の進行に伴って **CD57⁺T** 細胞亜集団が増加していたということを示したのみであるので、**CD57** の発現の診断的意義について言及できる結果ではない。しかし **CD8⁺CD57⁺T** 細胞と **CD4**

$^{+}CD57^{+}T$ 細胞は、腫瘍免疫を増強、あるいは減弱させるなどの報告もあることから、さらに複数のマーカーを使った検討により特殊なエフェクター細胞を同定できる、あるいはその患者のある免疫学的状態を評価する指標の 1 つとして利用できる可能性があるのではないかと考えている。

2. 本研究では $CD4/CD8$ バランスについては検討を行っていない。しかし、 $CD8^{+}CD57^{+}T$ 細胞は癌免疫に有利に働く細胞障害性 T 細胞で、 $CD4^{+}CD57^{+}T$ 細胞の増加は免疫抑制状態を反映していると考えられ、 $CD57^{+}T$ 細胞中の $CD4/CD8$ バランスを検討することは非常に重要であると考えられる。例えば早期癌において $CD57^{+}T$ 細胞中の $CD4/CD8$ バランスが $CD8$ に偏った症例では予後良好、あるいは $CD4$ に偏った症例では予後不良などの結果が出れば、 $CD57^{+}T$ 細胞中の $CD4/CD8$ バランスを予後因子として利用できる可能性が生まれると考えている。

本学位論文は、これまでに報告のない口腔扁平上皮癌患者末梢血における $CD57^{+}T$ 細胞亜集団について検討を行った貴重な報告であり、学術的価値が高いと思われる。また、申請者は本学位論文の内容について幅広い質問に的確に回答し、本研究課題について深い理解と洞察力を持っていることを示した。以上より、申請者は医学博士を授与されるに相当であると判断した。